

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PRODUCTION OF beta-AMYLASE

Potentinumero: JP60126080  
Julkaisupäivä: 1985-07-05  
Keksijä(t): NAKAI KUNIHARU, others 02  
Hakija(t): AMANO SEIYAKU KK  
Pyydetty patentti:  JP60126080  
Hakemusnumero: JP19830231831 19831208  
Prioriteettinumero(t):  
IPC-luokitus: C12N9/26  
EC-luokitus:  
Vastineet:

### Tilivistelmä

PURPOSE: To promote the production of beta-amylase, by culturing a beta-amylase-producing bacterial strain in a medium containing thioglycolic acid (salt).

CONSTITUTION: A beta-amylase-producing strain belonging to *Bacillus* genus (e.g. *Bacillus sereus* IFO-3001) is cultured in a synthetic medium or natural medium containing about 0.0001-0.05% (W/V) thioglycolic acid or its salt (e.g. sodium salt, ammonium salt, etc.) at about 25-35 deg.C and about 7.5-9pH for about 50-70hr under aerobic condition, and the objective beta-amylase is separated from the resultant cultured product. The thioglycolic acid (salt) is added to the medium preferably when the production of beta-amylase begins after the proliferation of the bacterial cells.

Tiedot otettu esp@cenetin tietokannasta - l2

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 昭60-126080

⑬ Int.Cl.

C 12 N 9/26  
//(C 12 N 9/26  
C 12 R 1:07)

識別記号

府内整理番号

7236-4B

⑭ 公開 昭和60年(1985)7月5日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称  $\beta$ -アミラーゼの製造法

⑯ 特 願 昭58-231831

⑰ 出 願 昭58(1983)12月8日

⑱ 発明者 中井 國治 知多市日長字神山畔16番地

⑲ 発明者 横井 信正 愛知県西春日井郡西春町大字野崎字乾出11

⑳ 発明者 大矢 隆一 愛知県西春日井郡西春町大字野崎字乾出15

㉑ 出願人 天野製薬株式会社 名古屋市中区錦1丁目2番7号

明細書

1. 発明の名称

$\beta$ -アミラーゼの製造法

2. 特許請求の範囲

バチルス属に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌を培地に培養して $\beta$ -アミラーゼを生成蓄積せしめ、これを採取する方法において、チオグリコール酸またはその塩を培地に添加することを特徴とする $\beta$ -アミラーゼの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、バチルス属に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌を培地に培養して $\beta$ -アミラーゼを生成蓄積せしめ、これを採取する方法において、培地に添加剤としてチオグリコール酸またはその塩を含有せしめて $\beta$ -アミラーゼの生産を増強する方法に関する。

$\beta$ -アミラーゼ（系統名：1,4- $\alpha$ -D-グルカンマルトハイドロラーゼ（1,4- $\alpha$ -D-Glucan maltohydrolase）、EC 3.2.1.2）は澱粉、グリコーゲン、デキストリンなどからマルトースを分離

する酵素として有用である。従来 $\beta$ -アミラーゼの供給源としては主として高等植物、たとえば大麦芽、小麦、大豆、甘藷などが知られている。近年バチルス属などの微生物に $\beta$ -アミラーゼの生産能が見いだされたが、多くは生産性が低く実用に至っているものは少ない。従来、バチルス属微生物による $\beta$ -アミラーゼ生産の改良法としては、たとえばバチルス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）を澱粉を含む培地に培養する方法（特公昭53-45393号公報）、バチルス・セレウス（*B. cereus*）を培養するに際し、バリウムイオンあるいはクエン酸または酒石酸を存在せしめた培地を用いる方法、種培養を特定のpHで行う方法（特公昭53-5748号公報、同52-30590号公報、同52-30589号公報）などが知られている。

本発明者らはバチルス属微生物による $\beta$ -アミラーゼの生産について鋭意研究したところ、これらバチルス属菌の $\beta$ -アミラーゼは、通気搅拌下深部培養を行うと、せっかく生産された $\beta$ -アミラーゼが失活してしまうという現象に気がつい

特開昭60-126080(2)

た。従来、バチルス属の $\beta$ -アミラーゼは、チオール酵素であること、チオール基と可逆的にメルカブチドを形成する試薬、たとえばP-クロロマーキュリ安息香酸によって阻害され、この阻害はシスチンのようなチオール化合物を過剰に加えることにより直ちに回復することが知られている。

(Agr. Biol. Chem. (アグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリー) 第38巻, 1023~1029頁 (1974)、同第40巻, 1523~1530頁 (1976) および同第43巻, 719~726頁 (1979))。そこで、本発明者らは各種チオール化合物を培地に添加して $\beta$ -アミラーゼの生産を試験したところ、意外にもチオグリコール酸またはその塩のみが $\beta$ -アミラーゼの失活防止に効果のあることを見いだし、本発明の完成に至ったものである。

本発明法において培地の添加剤として使用するチオグリコール酸またはその塩とは、チオグリコール酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリコール酸アンモニウムなどである。これら添加剤の培地への添加量は、菌の生育に阻害とならない

濃度であればよく、好ましくは0.0001~0.05% ( $w/v$ ) の範囲である。培地への添加時期は、培養の最初、または培養の途中のいずれでもよいが、好ましくは菌が生育して $\beta$ -アミラーゼが生産され始めた時期に添加するのがよい。添加回数は、一回でもまた數回添加してもよい。

本発明法で使用する微生物はバチルス属に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌であればいずれでもよく、例えばバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*)、バチルス・サークュランス (*B. circulans*)、バチルス・ポリミキサ (*B. polymyxa*) などが示される。より具体的にはバチルス・セレウス IPO 3001、バチルス・セレウス・バリエータス・マイコイデス (*B. cereus* var. *mycoides*) IAM 1190、バチルス・メガテリウム IAM 1030、バチルス・サークュランス IPO 3329、バチルス・ポリミキサ IPO 3020、バチルス・ポリミキサ ATCC 8523などの保存菌株が例示される。

本発明法により $\beta$ -アミラーゼを製造するには

、まずバチルス属に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌株を培地に培養して、培養物中に $\beta$ -アミラーゼを蓄積せしめる。培養方法は、細菌の一般的な培養方法が用いられる。たとえば、使用する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機物および発育素、並びにチオグリコール酸またはその塩を含む合成培地または天然培地が用いられる。炭素源としてはシュークロース、アミロース、アミロベクチン、ポテトスター、コーンスター、コーンミール、ワキシースター、デキストリン、有機酸など、窒素源としてはミルクカゼイン、ポリペプトン、大豆カゼイン、酵母エキス、肉エキスなど、無機塩としては塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、リン酸二カリウム、塩化亜鉛、塩化バリウム、硫酸カリウム、硫酸銅、塩化第二鉄、酸化カルシウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウムなど、発育素としてはビタミンB<sub>1</sub>、ビオチン、ビタミンB<sub>6</sub>、D-パンテン酸ナトリウム、イノシトールなどが用いられる。また、培養中の発泡を抑えるために、界面活性剤

、シリコン、植物油などの消泡剤を添加することもできる。

培養は、通常振盪または通気攪拌下好気的条件のもとにおこなうのがよい。培養温度は菌が生育し $\beta$ -アミラーゼが生産される範囲内であればいずれの温度でもよいが、好ましくは25~35℃である。培地のpHは通常 7.5~9.0 の範囲が好ましい。培養時間は $\beta$ -アミラーゼの生産が最大に達する時間を選べばよく、通常50~70時間である。

以上のようにして得られた培養物から $\beta$ -アミラーゼを採取するには、その理化学的性質を利用して、公知の蛋白質の精製法を適宜組み合わせて行うことができる。たとえば、培養物をろ過もししくは遠心分離して固体を除いたのち、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどを用いた塩析、エタノール、メタノール、アセトンなどを用いた有機溶媒沈殿、活性炭、シリカゲル、アルミナ、ヒドロキシアパタイト、セルロースなどを用いた吸着クロマトグラフィー、イオン交換樹脂、イオン交換セルロース、イオン交換セファデックスなどを

## 特開昭60-126080(3)

用いたイオン交換クロマトグラフィー、セファデックス、バイオゲルなどを用いたゲルろ過、電気泳動、限外ろ過、透析などの公知の方法を任意の順序で適宜組み合せ、または繰り返すことにより精製する。

次に、本発明における $\beta$ -アミラーゼ活性の単位について説明すると、0.5%可溶性澱粉液(pH 7.0、リン酸緩衝液)を基質として40℃、30分間反応せしめ、生じた還元糖量をフェーリング・レーマン・シュール(Fehling-Lehmann-Schöell)法により測定したとき、10mgのグルコースに相当する還元力のマルトースを生成する酵素量を1単位とした。

以下、試験例および実施例を以て本発明を詳しく説明する。

## 試験例

可溶性デンプン 1.0%、ミルクカゼイン 3.5%、酵母エキス 0.1%、塩化ナトリウム 0.01%、硫酸マグネシウム・7水塩 0.1%、リン酸二カリウム 0.4%、グリシン 0.075%、ビタミンB<sub>1</sub> 塩酸

塩 2ppm、クエン酸ナトリウム 0.03%および $\alpha$ -サイクロデキストリン 0.1%からなる組成の培地(pH 8.2) 50mLを 500mL容の坂口フラスコに入れて殺菌後、第1表に示すごとく、バチルス属の保存菌株を接種して振盪培養した。培養開始後0時間または16時間の各一回、または16時間と30時間の二回、チオグリコール酸ナトリウム、還元型グルタチオン、L-システイン塩酸塩または2-メルカブトエタノールを、各々の時間に0.01%または0.001%添加して、28℃において60時間培養した。培養液の $\beta$ -アミラーゼ活性を測定し、添加剤を加えない場合の活性を100%としたときの相対値を第1表に示す。同表からわかるように、チオール化合物のなかでもチオグリコール酸ナトリウムにのみ $\beta$ -アミラーゼの増産効果が認められ、還元型グルタチオン、L-システイン塩酸塩および2-メルカブトエタノールは効果が弱いか全く効果が無く、むしろ高濃度(0.01%)においては阻害的である。

第1表

菌 株 添加 時期 および濃度 (hr)	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> IAM 1190			<i>B. cereus</i> IFO 3001			<i>B. megaterium</i> IAM 1030			<i>B. polymyxa</i> IFO 3020			
	0	16	16.30	0	16	16.30	0	16	16.30	0	16	16.30	
無 添 加	100%			100%			100%			100%			
チオグリコール酸 ナトリウム	0.01%	134	162	177	139	154	161	111	157	158	123	143	149
	0.001	121	137	143	110	129	132	108	132	144	112	126	128
還元型グルタチオン	0.01	93	107	111	95	100	109	95	99	93	95	101	99
	0.001	101	110	105	98	102	107	102	104	109	94	105	103
L-システイン塩酸塩	0.01	36	47	51	47	44	53	28	42	58	33	56	61
	0.001	89	102	105	91	107	103	92	101	101	71	93	97
2-メルカブトエタノール	0.01	29	55	51	45	49	43	62	55	66	42	52	84
	0.001	83	98	101	95	88	87	78	91	102	87	101	98

第2表

## 実施例 1

可溶性デンプン 1.0%、ミルクカゼイン 3.5%、酵母エキス 0.1%、塩化ナトリウム 0.01%、硫酸マグネシウム 7水塩 0.1%、リン酸二カリウム 0.4%、グリシン 0.075%、ビタミンB<sub>1</sub> 塩酸塩 2ppm、クエン酸ナトリウム 0.03%およびβ-サイクロデキストリン 0.1%からなる組成の培地 (pH 8.2) 50mlを 500ml容の坂口フラスコに入れて殺菌後、バチルス・ポリミキサ IPO 3020 株を接種して振盪培養した。培養開始後、16時間または16時間と40時間の二回、チオグリコール酸、チオグリコール酸ナトリウムまたはチオグリコール酸アンモニウムを 0.01%または 0.001% 添加して、28℃において60時間培養したのち、培養液のβ-アミラーゼ活性を測定した。添加剤を加えない場合の活性を 100%としたときの相対値を第2表に示す。本発明法によってβ-アミラーゼが著しく増産されることがわかる。

添 加 剂	濃 度	添 加 時 期	
		16 hr	16, 40 hr
無 添 加	%	100	100
チオグリコール酸	0.001	137	140
	0.01	157	159
チオグリコール酸 ナトリウム	0.001	125	127
	0.01	158	154
チオグリコール酸 アンモニウム	0.001	132	136
	0.01	167	163

## 実施例 2

ポテトスター<sup>チ</sup> 0.5%、ポリベプトン 2.0%、リン酸二カリウム 0.3%、硫酸マグネシウム 7水塩 0.1%からなる組成の培地 (pH 7.5) 50mlを 500ml容坂口フラスコに入れて殺菌後、バチルス・セレウス IPO 3001 株一白金耳を接種し、28℃で 7 時間振盪培養し種培養液とした。次いで、実施例 1 と同じ組成の培地 15l の入った 30l 容ジャー

ーファーメンターに上記種培養液を接種して、温度 28℃、通気量 7.5L / 分、攪拌回転数 200rpm で培養した。培養開始後 16 時間と 30 時間の二回、チオグリコール酸ナトリウムを各 0.01% 添加して、60 時間培養した。

培養液の β-アミラーゼ活性を測定したところ、添加剤を加えない場合と比較して 169% の活性を示した。培養液を遠心分離して菌体を除いたのち、上清を限外ろ過濃縮し、次いでアルコール沈降をすることにより粗 β-アミラーゼ粉末 96g を得た。

特許出願人 天野製薬株式会社